

METODY KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY V DIAGNOSTICE MNOHOČETNÉHO MYELOMU

ROLE OF CLASSICAL AND MOLECULAR CYTOGENETICS FOR DIAGNOSIS OF MULTIPLE MYELOMA

KUGLÍK P.^{1,3}, VRANOVÁ V.¹, FILKOVÁ H.^{1,2}

¹ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

²ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PMDV

³UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

Souhrn

Jedním z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů u nemocných s mnohočetným myelomem je nález specifických aberací. Klasická cytogenetická analýza založená na analýze mitotických preparátů je u nemocných s mnohočetným myelomem limitovaná nízkou proliferativní aktivitou plazmatických buněk. Molekulárně cytogenetické metody, zejména technika interfázni fluorescenční hybridizace in situ (FISH), je relativně rychlá, citlivá a vysoce specifická metoda, která při použití vhodných centromerických či lokusově specifických DNA sond umožňuje detekovat početní a strukturní chromozómové odchylky v nedělicích se jádrech interfázni buněk. Na rozdíl od leukémií je u mnohočetného myelomu správné využití techniky FISH podmíněno separací nádorových buněk či identifikací plazmatických buněk v kostní dřeni. Práce shrnuje principy, výhody i omezení klasické a molekulární cytogenetiky a jejich modifikací používaných při vyšetřování cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. Jsou prezentovány nejčastější typy početních a strukturních chromozómových změn vyskytujících se v karyotypu nemocných s mnohočetným myelomem a jejich prognostický význam.

Klíčová slova: Chromozómové aberace, cytogenetika, FISH, mnohočetný myelom, prognostické faktory.

Summary

The presence and type of chromosomal abnormalities belong among the most important independent prognostic factors in patients with multiple myeloma. Classical cytogenetics based on the analysis of mitotic figures is often difficult due to the low proliferative index of malignant plasma cells. In order to circumvent this pitfall, molecular cytogenetics methods especially interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) with centromeric or locus specific DNA probes have been developed to study the most frequent numerical and structural chromosomal abnormalities observed in myeloma. The main difference to leukemias is that interphase FISH in myeloma needs to be coupled with plasma cell identification in the bone marrow specimens. The aim of this article is to summarize the principles, impact and limits of classical and molecular cytogenetic methods and their modifications used for the routine identification of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. We discuss the most common types of chromosomal aberrations in multiple myeloma and their prognostic importance.

Keywords: chromosomal aberration, cytogenetics, FISH, multiple myeloma, prognostic factors.

Úvod

Současný rozvoj nových technologií založených na poznatcích genetiky a molekulární biologie umožňuje zlepšení diagnostiky a prognostiky v onkologii. Molekulárně genetická vyšetření používaná v onkologii se rozrůstají s pokrokem znalostí o lidském genomu každým dnem. Význam těchto disciplín stále roste i s ohledem na stále účinnější protinádorovou léčbu či zavádění nových léčebných protokolů. Z tohoto hlediska se genetické abnormality charakterizující nádorovou buňku stávají prioritními z hlediska jejich využitelnosti v klinické praxi. U nádorových buněk můžeme pozorovat velmi pestrou a početnou škálu abnormalit. Častými genetickými změnami, které se v průběhu vzniku a vývoje nádoru objevují, jsou chromozómové aberace představující ztráty, zmožení či přemístění genetického materiálu.

Základním kamenem moderní nádorové cytogenetiky byl objev první specifické chromozómové odchylky u chronické myeloidní leukémie (CML) tzv. filadelfského (Ph) chromozómu. Tento chromozóm popsali *Nowell a Hungerford* v roce 1960 a nazvali jej podle města, kde byl objeven (24). V roce 1973 popsala *Rowleyová* vznik Ph chromozómu jako výsledek reciproké translokace mezi chromozómy 9 a 22 a tímto zjištěním položila základ dalšímu rozvoji onkocytogenetiky (27).

Od objevu filadelfského chromozómu bylo postupně nashromážděno mnoho poznatků dokazujících, že získané chromozómové změny, které se vyskytují u onkologických onemocnění, jsou integrální součástí procesu maligní transformace buněk (14).

Doposud bylo evidováno v Mitelmanově databázi na 53 000 různých typů abnormalit, které byly popsány

u různých hematologických malignit a solidních nádorů (22). Dnes jsou proto cytogenetické diagnostické metody spolu s řadou dalších vyšetření nedílnou součástí vstupní diagnostiky u mnoha onkologických onemocnění. Cytogenetická vyšetření nádorových buněk tak spolu s dalšími molekulárními technikami výrazně napomáhají charakterizaci biologických a klinických vlastností nádorů pro účely upřesnění diagnózy, stanovení prognózy, volby způsobu terapie či kontroly účinnosti léčby.

Cytogenetické změny u mnohočetného myelomu a jejich význam

Obdobně jako u jiných hematologických malignit i u MM se často setkáváme se specifickými klonálními početními i strukturními abnormalitami chromozómů, poměrně často se jedná o složité komplexní změny karyotypu. Z těchto důvodů je v posledních letech u nemocných s MM často považován za rozhodující prognostický faktor jejich úvodní cytogenetický nálezn. Na základě cytogenetických nálezů můžeme nemocné s MM rozdělit do různých genetických podskupin, které se liší v odpovědi na léčbu a v prognóze onemocnění. Studie prováděné během uplynulých let prokázaly, že přítomnost specifických aberací u pacientů s MM představuje rozhodující prognostický faktor jak při léčbě autologní transplantací, tak při užití vysokodávkované chemoterapie (5, 23, 26, 10). Prognostická stratifikace slouží i pro odlišení nemocných s vysokým rizikem náhlé transformace choroby, u nichž by měla být bezprostředně zahájena léčba. Intenzivně se též studuje význam cytogenetických změn při léčbě některými novými typy léků, jako jsou inhibitory angiogeneze či proteáz (32, 15). Přesné určení karyotypu myelomových buněk a včasná detekce prognosticky významných aberací

Podle literatury existují dvě hlavní cytogenetické podskupiny MM; hyperdiploidní varianta (H-MM) asociovaná s častým nálezem početních odchylek, zejména trizomií chromozómů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, a non-hyperdiploidní varianta (NH-MM) typická vysokou četností strukturních abnormalit chromozómů, zejména translokací postihujících IgH lokus lokalizovaný na chromozómu 14 (7, 9, 37).

Za nejčastější chromozómovou změnu u MM je považována delece dlouhých ramen chromozómu 13 – del(13)(q14), která se při klasickém cytogenetickém vyšetření objevuje u 15-20% a při použití FISH více než u poloviny nově diagnostikovaných pacientů s MM (7, 36). Většina autorů považuje tuto aberaci za špatný prognostický ukazatel, zejména pokud je nalezena v metafázních analýzách nebo pokud se vyskytuje v kombinaci s dalšími chromozómovými abnormalitami, jako je delece 17p13 a translokace t(4;14) (10). Rozsah delece může být různý, u většiny nemocných (až 90%) pravděpodobně dochází ke ztrátám celého 13. chromozómu (monosomie 13). Druhou nejčastější abnormalitou v karyotypu je nález hyperdiploidního buněčného klonu (47 – 74 chromozómů), který bývá přítomen asi u 50% pacientů s MM a je obvykle spojen s lepší prognózou než přítomnost hypodiploidie (méně než 46 chromozómů) nebo diploidie (7, 37, 35). Častým nálezem v karyotypu MM bývají strukturní přestavby postihující IgH lokus. K nejčastějším přestavbám zahr-

nujícím IgH lokus patří translokace t(11;14)(q13;q32), která se vyskytuje asi u 20% nemocných s MM. Podle některých autorů je provázána delším celkovým přežitím nemocných a na rozdíl od ostatních přestaveb 14q32 je považována spíše za příznivý prognostický ukazatel (7, 35, 8). Další specifickou strukturní aberací postihující IgH lokus je t(4;14)(p16;q32), která je popisována u asi 15% nemocných s MM. Tato translokace je obvykle provázána velmi agresivním průběhem onemocnění. Nepříznivou prognózu pro nemocné znamená rovněž nález translokace t(14;16)(q32;q23), která se vyskytuje asi u 5% případů s primárním MM a je též spojena s kratším přežitím a agresivním průběhem onemocnění (2, 10, 7, 35).

Za další klíčové genetické abnormality související s horší prognózou je považována delece oblasti 17p13 (gen p53), se kterou se setkáváme asi u 10% nemocných a v poslední době též zisk úseku 1q21 (gen CKS1B), který bývá popisován až u 40-70% pacientů (16, 12).

Konvenční cytogenetická analýza u mnohočetného myelomu

Z hlediska metodického je vyšetření změn u MM stejně jako u jiných hematologických malignit založeno buďto na klasické analýze karyotypu prostřednictvím pruhovacích technik (tzv. konvenční cytogenetika založená na Gimsa pruhování metafázních chromozómů), nebo na využití molekulárně cytogenetických metod.

Vstupní materiál

V případě konvenčních cytogenetických vyšetření u MM je vstupním materiálem ke stanovení karyotypu maligních linií kostní dřev (KD) pacientů. Základní podmínkou úspěšného cytogenetického vyšetření je v každém případě dostatečné množství biologického materiálu. Odběr materiálu (1-3ml KD) je prováděn sterilně do připravené zkumavky s obsahem malého množství (0,5 ml) heparinu. Důležitou podmínkou úspěšného cytogenetického vyšetření je, aby se jednalo o první frakci odběru kostní dřevě. Kultivace probíhá v různých kultivačních mediích, nejčastěji RPMI v termostatu při 37°C (může to být i *Panserin*, *Cytogen plus* atd. dle nabídky jednotlivých firem, ale se stejnou nutriční hodnotou). Po 24hodinové kultivaci (tzv. krátkodobá kultivace) nastává proces zpracování materiálu a příprava preparátů. Nezbytným krokem celého postupu je využití schopnosti působení kolchicinu na funkci dělicího vřeténka, tj. zastavení procesu buněčného dělení v metafázi. Následuje přidání hypotonického roztoku (0,075 M KCl na 10-20 minut), který umožní nabobtnání buňky, zvětšení jejího objemu a rozložení chromozómů v ekvatoriální rovině. Proces fixace buněk zahrnuje 3-4x opakované přidávání fixačního roztoku (metanol-kys. octová v poměru 3:1) vždy po odstředění a odsátí supernatantu. Vykapáním buněčné suspenze na předem odmaštěná a důkladně omytá podložní skla získáme cytogenetické preparáty vhodné pro další použití, tj. aplikaci barvicích metod cytogenetických nebo technik molekulárně cytogenetických.

I když metody metafázní cytogenetiky dosáhly v uplynulých letech značného rozvoje a jejich rezoluční možnosti se výrazně zvýšily, přesto má konvenční cytogenetická analýza zvláště u MM výrazná omezení. Výsledky cyto-

genetického vyšetření u MM jsou často limitovány nízkou infiltrací kostní dřeně nádorovými plazmatickými buňkami a s tím souvisejícím nízkým mitotickým indexem. Problémem může být i špatná morfologie chromozómů, která často nedovoluje přesnější lokalizaci zlomových míst.

Klonální chromozómové aberace podle údajů v literatuře nalzáme při konvenční cytogenetické analýze asi jen u 30% nemocných s mnohočetným myelomem (4, 31). U mnoha pacientů je však klasické cytogenetické vyšetření neúspěšné nebo neinformativní. V kultivaci tak nalzáme pouze buňky s normálním karyotypem. Přes tuto skutečnost má konvenční cytogenetika u MM stále velký význam. Tak např. případný abnormální cytogenetický nález delece 13q/monosomie 13 pozorovaný na mitózách přináší informaci nejen o strukturní abnormalitě chromozómů, ale svědčí i o zvýšené proliferaci patologických buněk, což samo o sobě již pro pacienta znamená špatnou prognózu (25).

Molekulární cytogenetika u mnohočetného myelomu

Nové možnosti v této oblasti přinesl rozvoj molekulárně cytogenetických metod, které pomohly překonat určitá metodologická omezení klasické cytogenetiky. Jedná se hlavně o techniku fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a její modifikace, která se začala intenzivněji používat v cytogenetických laboratořích od poloviny 80. let minulého století.

Základní metodou molekulární cytogenetiky je hybridizace *in situ*, která umožňuje zviditelnit sekvence nukleových kyselin přímo na mikroskopických preparátech obsahujících fixované a morfologicky zachovalé chromozómy nebo interfázni jádra. Molekulární hybridizace *in situ* je založena na použití značené jednořetězcové hybridizační sondy, tj. krátkého úseku DNA. Tato sonda se v důsledku komplementarity bazí může po denaturaci vázat k cílové sekvenci DNA buněk nacházejících se na mikroskopickém skle a umožnit tak detekci defektních genů či chromozómů v genomu nádorových buněk. Molekulárními metodami studované fragmenty DNA jsou přibližně 200 – 300 kilobází velké. Na základě konjugace DNA sondy s fluorochromem můžeme potom místa hybridizace detegovat prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. V naprosté většině případů jsou fluorescenční signály snímány velmi výkonnou CCD kamerou napojenou na počítač se speciálními programy pro FISH, citlivost metody se tak zvyšuje o několik řádů. Diagnostické postupy založené na metodách molekulární cytogenetiky dovolují rozlišit tak malé změny na chromozómech, které nebylo možno dříve v karyotypu prokázat. Další výhodou je, že metody FISH při použití vhodných DNA sond umožňují detegovat početní i strukturní chromozómové abnormality nejen v mitózách, ale i v nedělicích se interfázni jádrech (tzv. interfázni I-FISH). Tato skutečnost je zvláště významná při molekulárně cytogenetickém vyšetření MM, kde se jako vstupní materiál opět používá suspenze fixovaných buněk kostní dřeně, které jsou vykapány na mikroskopická skla. Zde už nevedí nízké hodnoty mitotického indexu, pro vyšetření je dostačující samotná přítomnost interfázni myelomových buněk ve vzorku.

Specifické problémy molekulárně cytogenetických vyšetření u nemocných s MM

I v případě molekulárně cytogenetických vyšetření vzorků MM ovšem někdy narážíme na problém nízké infiltrace kostní dřeně nádorovými myelomovými buňkami. U některých pacientů může být zastoupení plazmocytů mezi ostatními buňkami kostní dřeně menší než 5%. Ke správnému molekulárně cytogenetickému vyšetření myelomových buněk se proto používají následující přístupy:

a) morfologická identifikace nádorových plazmocytů v kostní dřeni v kombinaci s technikou I-FISH

V některých světových laboratořích jsou používány automatizované mikroskopické stanice, které umožňují provádět současně morfologické i genetické vyšetření jednotlivých buněk. Prvním krokem je morfologická identifikace nádorových myelomových buněk v nátěrech kostní dřeně za využití světelného mikroskopu na základě May Grunwald Giemsova barvení. Následně probíhá naskenování a zaznamenání souřadnic těchto buněk pomocí CCD kamery, mikroskopického stolku s automatizovaným posunem a počítače. Druhý krok spočívá v hybridizaci těchto preparátů se specifickými DNA sondami. Chromozómové abnormality jsou potom v celém vzorku kostní dřeně cíleně studovány pomocí fluorescenčního mikroskopu pouze u buněk, jejichž poloha na mikroskopickém preparátu odpovídá poloze morfologicky identifikovaných nádorových buněk. Citlivost této metody je srovnatelná s metodou RT-PCR, (10^{-3} - 10^{-4}), záchyt aberací je podstatně vyšší než u běžné FISH prováděné na plně kostní dřeni (13).

b) separace nádorových plazmocytů v kombinaci s technikou I-FISH

Separční metody umožňují získat populaci nádorových plazmocytů z buněk kostní dřeně o vysoké čistotě, na nichž provádíme následně molekulárně cytogenetické vyšetření. V laboratorní praxi se setkáváme nejčastěji s imunomagnetickou separací myelomových buněk pomocí CD 138+ specifické protilátky (AutoMacs) nebo s fluorescenční imunomagnetickou separací (FACSaria). Před vlastním cytogenetickým vyšetřením musí být separované buňky získány v dostatečném množství a vysoké čistotě a opět fixovány a vykapány na mikroskopická skla (6). Pro některé pokročilé molekulárně cytogenetické techniky (CGH, array-CGH) používáme separované buňky i pro izolaci DNA.

c) imunofluorescenční značení nádorových plazmatických buněk v kombinaci s metodou FISH (tzv. cIg-FISH)

Vyšší záchyt aberací umožňuje rovněž simultánní imunofluorescenční značení a molekulárně cytogenetické vyšetření klonálních plazmatických buněk prováděné přímo na mikroskopických preparátech s vykapávanými buňkami kostní dřeně. Preparáty hybridizujeme s příslušnými DNA sondami a myelomové plazmocyty identifikujeme mezi ostatními buňkami kostní dřeně pomocí fluorescenčně značených protilátek proti lehkým řetězcům cytoplazmatických imunoglobulinů, které jsou konjugované s fluorochromem AMCA. Při pozorování ve fluorescenčním mi-

kroskopu rozlišujeme jednotlivé nádorové buňky v kostní dřeni na základě sytě modrého zbarvení cytoplazmy a pouze v těchto značených buňkách následně vyšetřujeme aberace chromozómů metodou I-FISH (1, 19).

Zejména poslední dva způsoby cytogenetického vyšetření myelomových buněk jsou ve světových laboratořích rutinně využívány, v České republice většina cytogenetických laboratoří používá metodu imunofluorescenčního značení plazmatických buněk, která je u nás dobře standardizována a finančně méně nákladná.

Modifikace metody FISH

Další nevýhodou je, že techniky FISH používané k detekci aberací předpokládají přesnou znalost a charakterizaci postižených genů, a jsou proto vhodné pouze pro sledování omezeného počtu specifických přestaveb. Z těchto důvodů jsou v dnešní době neustále vyvíjeny a zdokonalovány nové postupy a modifikace techniky FISH, které umožňují analyzovat celý nádorový genom a hledat změny v počtu a lokalizaci genů či DNA sekvencí v jednom hybridizačním pokusu (tzv. metody celogenomového screeningu). K těmto metodám patří zejména technika chromozómové komparativní genomové hybridizace (CGH), která umožňuje detegovat a mapovat relativní počet kopií jednotlivých sekvencí mezi různými genomy (18). Při této technice nevyšetřujeme chromozómy, ale DNA testovaných buněk či tkání. Tato DNA z testovaného vzorku je spolu s kontrolní DNA z buněk s normálním karyotypem fluorescenčně označena, a to tak, že pro jejich označení jsou použity spektrálně odlišné fluorochromy (např. červená a zelená fluorescence). Obě DNA jsou následně smíchány v ekvimolárním poměru a hybridizovány na normální metafázní chromozómy. Po několikahodinové hybridizaci, odmytí nenavázané a nespecificky navázané sondy jsou chromozómy podbarvené pomocí fluorochromu DAPI, které umožňuje sestavení karyotypu. Následně je pomocí citlivé kamery registrován fluorescenční signál a použitím počítačového programu analyzovaný poměr fluorescence podél jednotlivých chromozómů. V případě, že DNA z testovaného vzorku neobsahuje žádné změny, všechny chromozómy se barví jednotně (poměr fluorescence testované a kontrolní DNA je 1). V případě, že vyšetřovaný vzorek obsahuje nadbytečný materiál nebo mu naopak určité oblasti scházejí, dochází v těchto oblastech ke změně poměru fluorescence. Odchylky < 0,8 jsou pak hodnoceny jako ztráty DNA sekvencí (delece či monozomie chromozómů), odchylky > 1,2 jako zisky genetického materiálu (duplikace, trisomie, amplifikace chromozómů). Rozlišovací schopnost CGH je asi 5-10 Mb. Technika CGH je nesmírně účinná při vyšetřování nebalancovaných změn, jako jsou delece, zisky nebo amplifikace některých genů, avšak nelze je využít při vyšetřování některých typů aberací, jako jsou reciproké translokace, inverze a inserce, při kterých se nemění poměr počtu kopií sekvencí DNA. Další podmínkou pro úspěšnou aplikaci této metody je čistota (nad 50% nádorových buněk ve vzorku) a dostatečné množství DNA. U pacientů s MM jsou proto tato vyšetření prováděna výhodně při vysoké infiltraci kostní dřeni myelomovými buňkami, popř. na separovaných myelomových buňkách s vysokou čistotou. Použití meto-

dy CGH u nemocných s MM umožnilo odhalit četné rekurentní nebalancované změny v nádorovém genomu jako zisky 1q, 5q, 9q, 11q, 19p nebo ztráty 6q, 8p a 16q, jejichž prognostický význam je stále studován (11).

Na stejném principu jako CGH je založeno vyšetření nemocných s MM pomocí mnohem citlivější metody array-CGH, která se liší tím, že jako podklad pro hybridizaci slouží tzv. DNA mikročipy, tj. klonované sekvence DNA nebo uměle syntetizované oligonukleotidy pokrývající oblasti vybraných genů nebo celý genom (3, 20).

Mezi pokročilé metody molekulární cytogenetiky patří i techniky mnohobarevných metafázních analýz, které dovolují barevně odlišit každý chromozómový pár v lidském karyotypu (mnohobarevná fluorescenční hybridizace *in situ* - mFISH, spektrální karyotypování - SKY), event. barevně odlišit jednotlivé pruhy na chromozómech (mBAND - mnohobarevné pruhování). Tyto nové metody umožňují mnohem detailnější analýzy jednotlivých strukturních změn typu delecí, amplifikací, translokací, inverzí a insercí a z těchto důvodů jsou používány zejména při vyšetření složitých karyotypů (33, 34, 21). Jako u klasických cytogenetických vyšetření je i u těchto moderních technik nezbytnou podmínkou dostatečný počet dobře rozprostřených mitóz. Z těchto důvodů jsou u pacientů s MM metody mFISH či spektrálního karyotypování používány jako doplněk klasické cytogenetiky zejména pro upřesnění míst zlomů či identifikaci drobných kryptických translokací a dalších přestaveb chromozómů (30, 29, 28).

Souhrnně lze říci, že po zavedení moderních molekulárních cytogenetických metod a zejména interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace prováděné na separovaných či selektivně značených buňkách se ukázalo, že specifické chromozómové abnormality nacházíme v genomu nádorových buněk až u 90% nemocných s MM (2, 17). V případě celogenomového screeningu abnormalit prováděného pomocí technologie array-CGH a oligonukleotidových DNA mikročipů uvádějí někteří autoři záchyt dokonce 100% (20).

Závěr

Nález specifických aberací je jedním z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů u nemocných s mnohočetným myelomem.

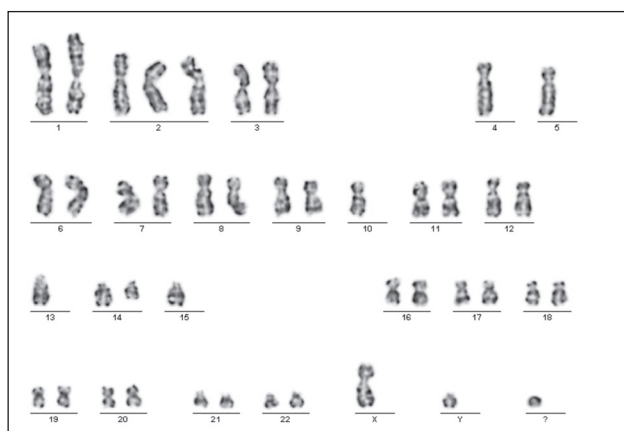
Cytogenetické vyšetření pacientů s MM pomocí konvenční cytogenetiky i techniky FISH je velmi náročné. Nízký počet plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich nízký mitotický index, přítomnost paraproteínu v cytoplazmě nádorových buněk a konečně i nezbytnost používat různé separační či simultánní barvicí techniky pro identifikaci myelomových buněk výrazně znesnadňují rutinní cytogenetickou diagnostiku. Přes tyto skutečnosti jsou metody molekulární cytogenetiky, zejména interfázní FISH, zatím nejúčinnějším přístupem k odhalování změn u tohoto onemocnění. V roce 2005 proběhlo v Londýně pracovní setkání Evropské myelomové skupiny, na kterém byly přijaty společné závěry a doporučení týkající se sjednocení metodiky a standardizace molekulárních cytogenetického vyšetřování pacientů s MM (26). Hlavní důraz je kladen na požadavek používat některou z metod identifikace nádorových plazmocytů a vyšetřovat u pacientů s MM zejména všechny klíčové chromozómové aberace s již známým

negativním prognostickým významem (delece 13q, delece 17p13, translokace t(4;14), translokace t(14;16)). 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 bude význam cytogenetických vyšetření i v budoucnu stále větší.

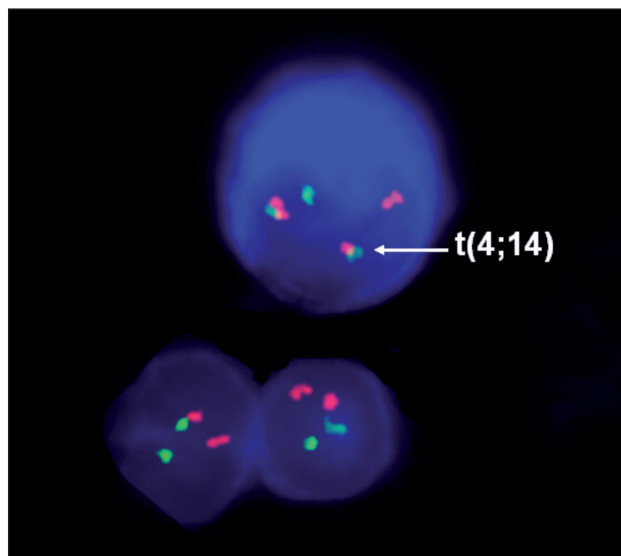
Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM002162245.

Ukázka reprezentativního výsledku cytogenetických vyšetření



Obrázek č. 1: Ukázka vyšetření chromozómových abnormalit u pacienta s mnohočetným myelomem metodou G-pruhování (43, XY, der(1), +2, -4, -5, -10, -13, der(14)del(14q), -15, +mar) (*OLG FN Brno, 2007*)



Obrázek č. 2: Ukázka vyšetření aberací u nádorové plazmatické buňky mnohočetného myelomu pomocí imuno fluorescenčního barvení cytoplazmatických imunoglobulinů a techniky FISH. Plazmatická buňka vykazuje translokaci t(4;14) (dva fúzní signály).

Typ změny	Geny	Prognóza
hyperdiploidie	47-74 chromozómů	příznivá
t(11;14)(q13;q32)	IGH/CCND1	příznivá
monozomie13/delece13q14	RB1, D13S25	středně příznivá
delece 17p13	p53	nepříznivá
zisk/amplifikace 1q21	CKS1B	nepříznivá
t(4;14)(p16;q32)	IGH/FGFR3	nepříznivá
t(14,16)(q32;q23)	IGH/MAF	nepříznivá

Tabulka č. 1: Přehled některých prognosticky důležitých aberací chromozómů u mnohočetného myelomu vyšetřovaných pomocí DNA sond a metody FISH

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.
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al.: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood.* 2007;109: 3489-3595.
- Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, et al.: High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell.* 2006;9: 313-325.
- Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, et al.: The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood.* 1985;66: 380-390.
- Facon T, Avet-Loiseau H, Guillemin G, et al.: Chromosome 13 ab-

normalities identified by FISH analysis and seru b2-microglobulin produce a very powerful myeloma staging system for patients receiving high dose therapy. *Blood.* 2001;97: 1566-71.

- Fišerová A, Hájek R, Holubová V, et al.: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma.* 2002;49(5): 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, Blood EA, Oken MM, et al.: Myeloma and the t(11;14) (q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood.* May 2002;15:99(10): 3735-41.
- Fonseca R., Debes-Marun CS, Picken EB, et al.: The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood.* 2003;102: 2562-2567.

10. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al.: Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*. 2007;21: 143-150.
11. Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM, et al.: Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*. 2004;104: 2661-2666.
12. Hanamura I, Steward JP, Huang Y, et al.: Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006;108: 1724-1732.
13. Hardan I, Rothman R, Gelibter A., et al.: Determination of chromosome 13 status in bone marrow cells of patients with multiple myeloma using combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis. *Exp. Hematol*. 2004;32: 254-260.
14. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. Second Edition. Wiley-Liss, Inc., New York 1995.
15. Chang H, Trieu Y, Qi X, et al.: Bortezomib therapy response is independent of cytogenetic abnormalities in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk Res*. 2006;31: 779-82.
16. 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.
17. Christensen JH, Abildgaard N, Plesner T, et al.: Interphase fluorescence in situ hybridization in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance without and with positive plasma cell identification: analysis of 192 cases from the Region of Southern Denmark. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007;174: 89-99.
18. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258: 818 – 21.
19. 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. (suppl.)* 12: 170, 2004.
20. Largo C, Saez B, Alvarez S, et al.: Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocation. *Haematologica/the hematology journal*. 2007;92: 795-802.
21. Michalová K, Zemanová Z, Březinová J: Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace. *Časopis lékařů českých*. 2001;140: 99-103.
22. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2008). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
23. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al.: Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100: 1579-83.
24. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132: 1497.
25. Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW, et al.: Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;113: 73-77.
26. Ross FM, Avet-Loiseau H, Drach J, et al.: European myeloma network recommendation for FISH in myeloma. *Vyd. Vol. 92(s2)*. Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s.100-101. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
27. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243: 290-293.
28. Saez B, Martín-Subero JI, Largo C, et al.: Identification of recurrent chromosomal breakpoints in multiple myeloma with complex karyotypes by combined G-banding, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization analyses. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;169: 143-149.
29. Sawyer JR: Multicolor spectral karyotyping in multiple myeloma. *Methods Mol. Med*. 2005;113: 49-58.
30. Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL, et al.: Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2001;112: 167-174.
31. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath, et al.: Cytogenetic finding in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;82: 41-49.
32. Schreiber S, Ackerman J, Obermair A, et al.: Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone marrow neovascularization. *Br J. Haematol*. 2000;110: 605-609.
33. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, et al.: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996;273: 494 – 497.
34. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC: Computer image analysis of combinatorial multi-color FISH. *Bioimaging*. 1996;4: 52 – 64.
35. Steward AK, Bergsagel PL, Greipp PR, et al.: A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patients counseling and choice therapy. *Leukemia*. 2007;21: 529-534.
36. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, et al.: Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood*. 1995;Dec 1;86(11): 4250-6.
37. Wuilleme S, Robillard N, Lode L, et al.: Ploidy, as detected fluorescence in situ hybridization defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19: 275-278.