

VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ ANALÝZY IMUNOFLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH PLASMATICKÝCH BUNĚK U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM ZAŘAZENÝCH VE STUDII CMG 2002

MOLECULAR CYTOGENETIC ANALYSIS OF IMMUNOFLUORESCENCE-LABELED PLASMA CELLS OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA ENROLLED IN CMG 2002 CLINICAL TRIAL

ZEMANOVÁ Z.¹, MICHALOVÁ K.⁵, TAJTLOVÁ J.¹, PAVLIŠTOVÁ L.¹, OLTOVÁ A.², FILKOVÁ H.^{2,3}, KUGLÍK P.³, NĚMEC P.^{3,4}, HOLZEROVÁ M.⁵, BALCÁRKOVÁ J.⁵, JAROŠOVÁ M.⁵, RABASOVÁ J.⁶, HRUBÁ M.⁷, FISCHLOVÁ H.⁷, ŠPIČKA I.⁸, GREGORA E.⁹, ADAM Z.¹⁰, ŠČUDLA V.¹¹, MAISNAR V.¹², SCHŮTZOVÁ M.¹³, KRÁLOVÁ D.⁴, HÁJEK R.^{4,10}
PRO ČESKOU MYELOMOVOU SKUPINU (CMG).

¹ CENTRUM NÁDOROVÉ CYTOGENETIKY, ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY, VFN A I. LF UK V PRAZE.

² ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO

³ ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE PŘF MU BRNO

⁴ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

⁵ HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA FN A LF OLOMOUC

⁶ ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN HRADEC KRÁLOVÉ

⁷ ÚSTAV LÉKAŘSKÉ GENETIKY, LF UK A FN PLZEŇ

⁸ I. INTERNÍ KLINIKA, VFN A I. LF UK V PRAZE

⁹ ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN KRÁLOVSKÉ VINOHRADY, PRAHA

¹⁰ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN A LF MU BRNO, PMDV

¹¹ III. INTERNÍ KLINIKA, FN A LF PU OLOMOUC

¹² ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN HRADEC KRÁLOVÉ

¹³ HEMATOLOGICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ FN PLZEŇ

Souhrn

V letech 2004-2006 jsme u 208 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) zařazených do studie CMG 2002 vyšetřili imunofluorescenčně značené plasmatické buňky metodou cIg-FISH. Sledovali jsme frekvenci a prognostický význam specifických chromosomových aberací. U 52,9% pacientů jsme detekovali aberace chromosomu 13, přestavby *IgH* genu jsme prokázali u 58,6% nemocných. Deleci genu *p53* a zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 mělo 21,6%, respektive 37,7% nemocných. Na základě výsledků statistické analýzy jsme prokázali, že přestavby *IgH* genu, zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 a současný výskyt více než dvou genetických aberací jsou spojeny s agresivnějším průběhem a horší prognózou onemocnění. Naopak jsme ve studii CMG 2002 neprokázali prognostický význam aberací chromosomu 13 a příznivý vliv t(11;14)(q13;q32). Potvrdili jsme, že chromosomové aberace v plasmatických buňkách jsou velmi heterogenní a často dochází k jejich kumulaci. Při stanovení prognózy nemocných je proto vždy nutné posuzovat současně všechny změny prokázané v karyotypu.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, cytogenetika, FISH, chromosomové abarace.

Summary

From 2004 to 2006 we have used cIg-FISH method to analyze immunofluorescence-labeled plasma cells from 208 patients with multiple myeloma (MM) enrolled in the CMG 2002 clinical trial. The aim of our study was to evaluate the frequency and prognostic impact of selected chromosomal aberrations. Chromosome 13 aberrations were found in 52,9% of patients, *IgH* gene translocations in 58,6% of patients, *p53* gene deletions in 21,6% of patients, and 1q21 gains in 37,7% patients. Statistical analysis has shown that *IgH* translocations, 1q21 gain, and simultaneous presence of more than two different genetic aberrations were associated with aggressive course of the disease and poor prognosis. We have not confirmed the putative negative prognostic impact of chromosome 13 aberrations and the favorable prognosis associated with t(11;14)(q13;q32). There was a high degree of heterogeneity of genetic abnormalities in plasma cells and a high prevalence of multiple aberrations. Complex analysis of all detected chromosomal abnormalities is necessary for the evaluation of their impact on prognosis.

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

příklady využití

Úvod

Za jeden z nejdůležitějších prognostických faktorů je u nemocných s MM považován nález klonálních chromosomových aberací v plasmatických buňkách v době stanovení diagnózy (4). K nejčastějším cytogenetickým nálezům u MM patří delece *RB1* genu v oblasti 13q14 a/nebo ztráta celého chromosomu 13 a translokace *IgH* genu v oblasti 14q32 (3, 5). *IgH* vstupuje do translokací s různými partnerskými geny a tyto přestavby jsou většinou spojeny se špatnou prognózou (4). Výjimku tvoří translokace t(11;14)(q13;q32), která je některými autory považována za příznivý prognostický ukazatel (6). V novějších studiích však příznivý prognostický význam této translokace nebyl potvrzen (2) a proto je v současnosti považována za prognosticky „neutrální“. K nepříznivým prognostickým faktorům patří dále nález amplifikace oblasti 1q21 a delece tumor supresorového genu *p53*.

Soubor pacientů a metodika

Konvenční cytogenetickou analýzou a metodou cIg-FISH jsme vyšetřili imunofluorescenčně značené plasmatické buňky u celkem 208 pacientů s MM, kteří byli v letech 2003-2006 zařazeni do studie CMG 2002 (125 mužů, 83 žen; průměrný věk 56 let, medián 57 let). Medián sledování je 30,4 měsíců. Klinická charakteristika souboru je shrnuta v Tabulce č. 1.

Klinický stav (Durie-Salmon)	Stav I	12 (5,8%)
	Stav II	50 (24,0%)
	Stav III	146 (70,2%)
Typ paraproteinů (n=193)	IgG	124 (64,3%)
	IgA	48 (24,9%)
	lehké řetězce	7 (3,6%)
	volné řetězce	6 (3,1%)
	B-J	5 (2,6%)
	IgM	2 (1,0%)
ISS (n=188)	IgD	1 (0,5%)
	ISS 1	66 (35,1%)
	ISS 2	65 (34,6%)
	ISS 3	57 (30,3%)
Léčebná odpověď (6 měsíců po transplantaci)	ORR	77 (88,5%)
	CR	10 (11,5%)
	VGPR	28 (32,2%)
	PR	39 (44,8%)
	MR	5 (5,8%)
	SD	1 (1,1%)
	PG	4 (4,6%)

Tabulka č. 1: Klinická charakteristika souboru

ORR (overall response rate) četnost objektivní odpovědi; CR (complete response) celková odpověď; VGPR (very good partial response) velmi dobrá částečná odpověď; PR (partial response) částečná odpověď; MR (minimal response) minimální odpověď; SD (stable disease) stabilní onemocnění; PG (progression) progres.

K analýze značených plasmatických buněk ve stádiu interfáze jsme použili I-FISH s lokus-specifickými sondami (Abbott-VYSIS™, Kreatech Biotechnology™), při jejich aplikaci jsme postupovali podle návodů doporučených výrobcem. U každého vzorku jsme hodnotili alespoň 50 plasmatických buněk. Hladina „cut-off value“ byla stanovena na 20% pro detekci delece 13q14 a *p53* a na 10% pro detekci translokací *IgH* genu a amplifikace 1q21 (*Workshop of the European Myeloma Network, 22. 1. 2007, Nantes, Francie – dosud nepublikováno*).

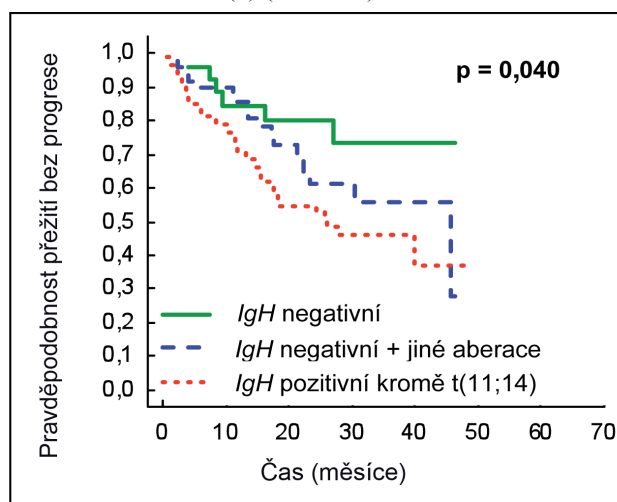
U všech nemocných zařazených do studie jsme provedli cIg-FISH se sondami pro detekci del(13)(q14) a přestavby 14q23. U nemocných s prokázaným zlomem v *IgH* genu jsme dále pokračovali v hybridizaci se sondou pro detekci translokace t(11;14)(q13;q32). Kromě toho jsme u vybra-

ných pacientů retrospektivně vyšetřili archivovaný materiál se sondami pro detekci translokace t(4;14)(p16;q32), zisku chromosomového materiálu v oblasti 1q21 a delece tumor supresorového genu *p53* (17p13).

Výsledky a diskuze

Metodou konvenční cytogenetické analýzy jsme detekovali chromosomové aberace celkem u 19,2% nemocných s MM. Nejčastěji se jednalo o strukturní aberace a/nebo komplexní přestavby karyotypu (26x), u 14 pacientů jsme detekovali aneuploidie. Normální karyotyp mělo 64,9 % nemocných a u 15,9% nemocných bylo cytogenetické vyšetření neinformativní. Analýza délky přežití prokázala statisticky významně kratší dobu přežití (OS, p=0,002 a PFS, p=0,001) u pacientů s komplexním karyotypem. Metodou cIg-FISH jsme prokázali přítomnost chromosomových aberací u 83,7% nemocných s MM. Aberace chromosomu 13 jsme detekovali celkem u 52,9% pacientů. Prognostický vliv monosomie/delece 13q na délku přežití nemocných nebyl v této studii prokázán (OS, p=0,955 a PFS, p=0,315). Předpokládáme, že prognózu pacientů bez prokázaných aberací chromosomu 13 negativně ovlivňují jiné genetické aberace, které mohou být přítomny v genomu plasmatických buněk.

Přestavby *IgH* genu jsme ve sledovaném souboru prokázali celkem u 58,6% nemocných. Statistická analýza potvrdila u pacientů s aberacemi *IgH* signifikantně kratší dobu přežití bez progresu (PFS, p=0,040), což odpovídá údajům v odborné literatuře (5) (Graf č. 1).



Graf č. 1: Analýza délky přežití bez progresu (PFS) u nemocných rozdělených do skupin podle výsledků cIg-FISH se sondou pro detekci přestavby *IgH* genu. Statistická analýza prokázala signifikantně kratší PFS ve skupině nemocných s prokázanými aberacemi *IgH* genu kromě translokace t(11;14)(q13;q32) ve srovnání s ostatními pacienty (p=0,040).

Translokace t(11;14)(q13;q32) byla prokázána u 18,5% nemocných z této skupiny. Výsledky analýzy délky přežití nepotvrdily ve studii CMG 2002 příznivý prognostický význam této translokace (OS, p=0,707 a PFS, p=0,702). Pouze u tří pacientů však byla t(11;14)(q13;q32) detekována jako samostatná změna v karyotypu, ve všech ostatních případech se vyskytovala v kombinaci s dalšími chromosomovými aberacemi, které mohly mít nepříznivý

příklady využití

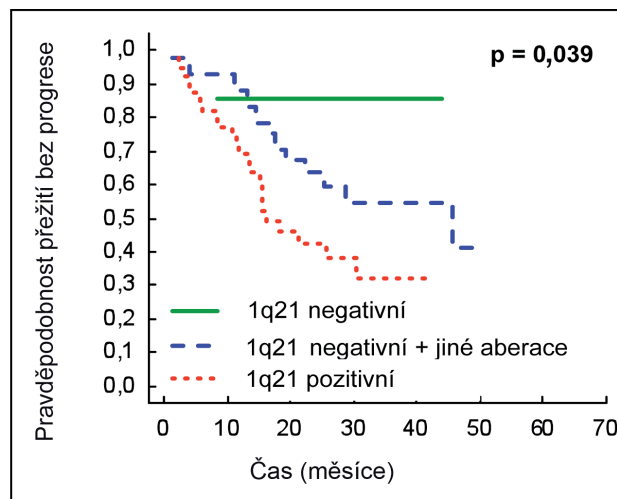
vliv na průběh a prognózu onemocnění. Translokaci t(4;14)(p16;q32) jsme detekovali u 15,8% nemocných. Z výsledků statistické analýzy je patrná tendence ke kratšímu přežívání u pacientů s prokázanou translokací ve srovnání s ostatními skupinami, rozdíl je však pod hladinou statistické významnosti ($p=0,180$). Delecí genu *p53* jsme prokázali u 21,6% pacientů ve studii CMG 2002, nepotvrdili jsme nepříznivý prognostický význam této aberace při stanovené hladině cut off 20% (OS, $p=0,796$ a PFS, $p=0,601$). Podle nedávno publikovaných údajů má však tato aberace negativní prognostický význam, až pokud je přítomna ve více než 60% plasmatických buněk (1). Zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 jsme detekovali celkem u 37,7% vyšetřených nemocných. Statistická analýza prokázala ve studii CMG 2002 významně kratší dobu přežití u pacientů s touto aberací (OS, $p=0,020$ a PFS $p=0,039$; Graf č. 2).

Hodnotili jsme rovněž prognostický význam kumulovaných aberací. Ve sledovaném souboru jsme pouze u 22,4% nemocných detekovali některou z aberací jako samostatnou změnu v karyotypu, u dalších 77,6% případů jsme prokázali současný výskyt dvou a více chromosomových změn. Statistická analýza prokázala u pacientů s více než dvěma aberacemi významně kratší dobu přežití (OS, $p=0,007$ a PFS, $p=0,001$).

Závěr

Komplexní molekulárně cytogenetická analýza značených plasmatických buněk podstatně zvyšuje záchyt chromosomových aberací u nemocných s MM. Ve studii CMG 2002 jsme jednoznačně prokázali, že přestavby *IgH* genu, zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 a současný výskyt více než dvou aberací jsou spojeny s agresivnějším průběhem a horší prognózou onemocnění. Naopak jsme

v této skupině neprokázali prognostický význam delecí/monosomie chromosomu 13 a příznivý vliv t(11;14)(q13;q32). Potvrdili jsme, že chromosomové změny v plasmatických buňkách jsou velmi heterogenní a často dochází k jejich kumulaci. Pro přesné stanovení prognózy nemocných je proto vždy nutné hodnotit současně všechny aberace přítomné v karyotypu.



Graf č. 2: Analýza PFS u nemocných s prokázaným ziskem chromosomového materiálu v oblasti 1q21. Statistická analýza prokázala významně kratší dobu přežití ve skupině pacientů s touto aberací ve srovnání s ostatními skupinami (PFS $p=0,039$)

Poděkování

Práce byla podpořena granty IGA NR/8183-4, MZO00064165, MSM0021620808, MŠMT LC535, MSM0021622415, MSM0021622434 a MŠMT LC06027.

Literatura

1. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al.: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, 2007 Apr 15; 109(8):3489-3495.
2. Avet-Loiseau H., Daviet A., Saunier S., Bataille R: Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *British Journal of Haematology*, 2000, 111: 1116-1117.
3. 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 Sep 1; 100(5): 1579-1583.
4. Smajda NV, Bastard C, Brigaudeau C, et al.: Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001 Oct 1; 98(7): 2229-2238.
5. Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR, et al.: A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia*. 2007 Mar; 21(3):529-34.
6. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, et al.: Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplant, *J Clin Oncol* 1997, 15: 2659-2666.