

### STANOVENÍ HYPERDIPLOIDIE U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM POMOCÍ IMUNOFLUORESCENČNÍHO ZNAČENÍ PLAZMATICKÝCH BUNĚK A TECHNIKY TŘÍBAREVNÉ INTERFÁZNÍ FISH

### DETECTION OF HYPERDIPLOIDY IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA USING IMMUNOFLUORESCENT STAINING OF PLASMA CELLS AND THREE-COLOR INTERPHASE FISH TECHNIQUE

SMETANA J.<sup>1</sup>, KUGLÍK P.<sup>1</sup>, GREŠLIKOVÁ H.<sup>1,2</sup>, KUPSKÁ R.<sup>2</sup>, FILKOVÁ H.<sup>1,3</sup>, OLTOVÁ A.<sup>3</sup>, HÁJEK R.<sup>2,4,5</sup>

<sup>1</sup>ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>2</sup>UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>3</sup>ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup>LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup>INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V předkládané práci uvádíme příklad využití imunofluorescenčního značení nádorových plazmatických buněk a techniky tříbarevné interfázni fluorescenční in situ hybridizace se specifickými DNA sondami pro chromozómy 5, 9 a 15 k detekci hyperdiploidních karyotypů u nemocných s mnohočetným myelomem.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, cytogenetika, FISH, hyperdiploidie.

#### Summary

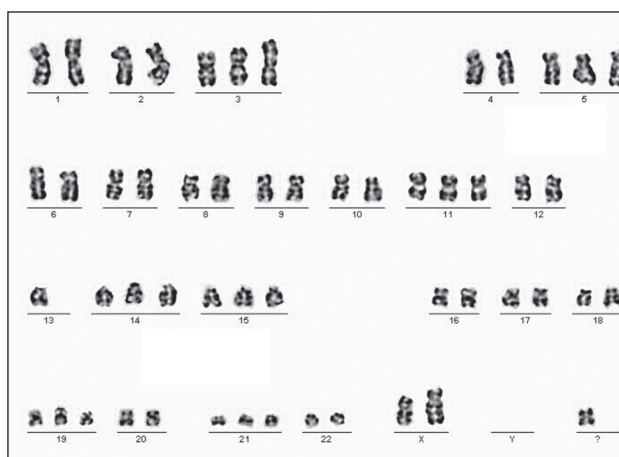
We focus on the applications of immunofluorescence labeling of tumor plasma cells and three-color interphase in situ hybridization with specific DNA probes for chromosome 5, 9, and 15 for the detection of hyperdiploidy in multiple myeloma.

**Keywords:** multiple myeloma, cytogenetics, FISH, hyperdiploidy.

#### Úvod

U mnoha nádorových onemocnění se setkáváme s početními změnami chromozómů. Tyto změny mohou postihovat jednotlivé chromozómy v buňce (aneuploidie), nebo se mohou týkat zmnožení celých sad chromozómů (polyploidie). Také u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) jsou početní odchylky chromozómů velmi častým nálezem vyskytujícím se až u 2/3 pacientů (3). U MM jsou podle počtu chromozómů zjednodušeně rozlišovány dvě hlavní genetické podskupiny; hyperdiploidní varianta (H-MM), kam jsou zařazováni nemocní s výskytem 47 až 74 chromozómů v karyotypu a non-hyperdiploidní varianta (NH-MM) zahrnující nemocné s hypodiploidními (méně než 44 chromozómů), pseudodiploidními (45 až 46 chromozómů) a téměř tetraploidními (více než 75 chromozómů) cytogenetickými nálezy (1, 6). Zatímco nález hyperdiploidního buněčného klonu je obvykle spojen s lepší prognózou, kdy průměrně 33% pacientů přežívá dobu 5 let od prvotního stanovení diagnózy, u nemocných s nonhyperdiploidními karyotypy průměrně pouze 10% pacientů přežívá 5 let (1). Základní metodou stanovení hyperdiploidie je hodnocení metafázních chromozómů pomocí klasické cytogenetiky (Obrázek č.1). Vzhledem k nízké výtěžnosti této techniky jsou využívány pro stanovení početních změn chromozó-

mů i metody průtokové cytometrie založené na stanovení DNA indexu a techniky interfázni FISH (6).

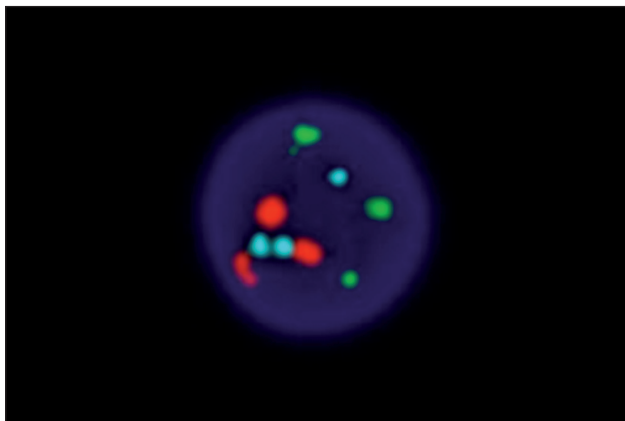


**Obrázek č. 1:** Ukázka hyperdiploidního karyotypu u pacienta s mnohočetným myelomem detekovaným metodou G-pruhování (53,XX,+3,+5,+11,-13,+14,+15,+19,+21,+mar). (OLG FN Brno, 2007)

V naší laboratoři je detekce H/NH karyotypů u pacientů s MM prováděna pomocí simultánního imunofluorescenčního značení klonálních plazmatických buněk a techniky

## příklady využití

tříbarevné interfázní FISH se specifickými sondami pro chromozómy 5, 9 a 15, které bývají nejčastěji zmnóžené u nemocných s hyperdiploidním karyotypem (1, 2). V předkládané práci prezentujeme výsledky stanovení hyperdiploidie pomocí této techniky ve vzorcích kostní dřevě u souboru 74 pacientů s mnohočetným myelomem.



**Obrázek č. 2:** Ukázka vyšetření chromozómových aberací u nádorové plazmatické buňky mnohočetného myelomu pomocí imunofluorescenčního barvení cytoplazmatických imunoglobulinů a techniky tříbarevné interfázní FISH. Plazmatická buňka vykazuje trisomii chromosomu 5, 9 a 15 (3 kopie chromosomu 5 - zelený signál, 3 kopie chromosomu 9 - modrý signál a 3 kopie chromosomu 15 - červený signál). (Smetana, 2007)

### Soubor pacientů a metodika

Metodou tříbarevné interfázní techniky FISH bylo vyšetřeno celkově 74 pacientů zařazených do studie Velcade/Thalidomid (37 žen, 37 mužů, průměrný věk 64,9 let, medián 65,1 let).

K identifikaci nádorových plazmocytů a stanovení hyperdiploidie byla využívána technika cIg-FISH založená na imunofluorescenčním značení lehkých řetězců cytoplazmatických imunoglobulinů (5) s využitím kitu DNA sond firmy Abbot-Vysis™ (LSI D5S23/D5S721, CEP 9, CEP 15 Multi-Color Probe Panel). Tento kit je tvořen specifickými DNA sondami pro chromozómy 5, 9 a 15, které jsou označeny třemi odlišnými fluorochromy – Spectrum Green, Spectrum Orange a Spectrum Aqua (Obr.2). Jednotlivé preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu

Olympus BX61 vybaveného digitální kamerou Vosskuhler 1300D a systémem analýzy obrazu LUCIA-KARYO/FISH/CGH (Laboratory Imaging, s.r.o, Praha). Na každém preparátu bylo hodnoceno minimálně 100 myelomových buněk. Jako hyperdiploidní byla klasifikována buňka, u které byly zmnóžené alespoň dva ze tří studovaných chromozómů ve více než 20% hodnocených buněk (6).

### Výsledky

Pomocí techniky cIg-FISH s sondami pro chromozómy 5, 9 a 15 byla prokázána přítomnost hyperdiploidie celkově u 48% pacientů (35 z 74), non-hyperdiploidní karyotypy byly nalezeny u 52% pacientů (39 ze 74). V naší studii jsme zároveň potvrdili, že nemocní s hyperdiploidním karyotypem mají výrazně nižší výskyt translokace t(4;14) oproti nemocným s non-hyperdiploidním karyotypem (15% oproti 49%). Incidence dalších strukturních aberací typických pro MM (delece 13q14/monozomie 13 a delece genu p53) byla u H-MM pacientů také výrazně nižší (23% oproti 56%).

Analýza vztahů mezi H/NH karyotypy a dalšími klinickými parametry, zejména přežíváním pacientů u sledovaného souboru nemocných s MM, je součástí probíhající studie.

### Diskuse a závěr

Zavedení techniky tříbarevné interfázní FISH a vyšetřování hyperdiploidie u nemocných s MM doplňuje informace o genetické nestabilitě nádorových buněk, má přímý vztah k prognóze onemocnění i zásadní význam pro správné hodnocení dalších klíčových chromozómových aberací. Z literatury je známo, že hyperdiploidní karyotyp může u nemocných s MM maskovat přítomnost delece 13q14 a delece genu p53 stanovenou v interfázních nádorových buňkách metodou FISH až u jedné třetiny pacientů (4). Proto by měl být kladen důraz na vyšetřování hyperdiploidie jako důležité součásti panelu prognosticky významných chromozómových abnormalit sledovaných u pacientů s MM.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a VZ MŠM002162245.

### Literatura

1. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S., et al: Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. 2003;17: 427-436.
2. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al.: Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research*. 2004;64: 1546-1558.
3. 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.
4. Koren-Michowitz M, Hardan I, Berghoff J, et al: Chromosome 13q

deletion and IgH abnormalities may be both masked by near-tetraploidy in a high proportion of multiple myeloma patients: A combined morphology and I-FISH analysis. *Cancer Letters*. 2007;255: 307-314.

5. 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
6. Wullemme 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.