

# IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE BUNĚK Z KOSTNÍ DŘENĚ U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM – STANOVENÍ DELECE 13q14 POUŽITÍM INTERFÁZNÍ FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE

## IMMUNOMAGNETIC SEPARATION OF BONE MARROW CELLS IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS – DETECTION OF 13q14 DELETION USING INTERPHASE FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

SMEJKALOVÁ J.<sup>1</sup>, VRANOVÁ V.<sup>4</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>1</sup>, KUGLÍK P.<sup>4</sup>, FILKOVÁ H.<sup>3</sup>, HEINIGOVÁ J.<sup>1</sup>, ADAM Z.<sup>2</sup>, KREJČÍ M.<sup>2</sup>, BÜCHLER T.<sup>1,2</sup>, KALÁBOVÁ V.<sup>2</sup>, OLTOVÁ A.<sup>3</sup>, VORLÍČEK J.<sup>2</sup>, PENKA M.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO BOHUNICE

<sup>2</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO BOHUNICE

<sup>3</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO BOHUNICE

<sup>4</sup> KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU, BRNO

**Souhrn:** *Východisko:* Chromosomální aberace jako je delece 13q14 jsou důležitým prognostickým faktorem u mnohočetného myelomu. Nízká mitotická aktivita maligních plazmatických buněk a jejich slabý růst v buněčných kulturách snižuje dostupnost cytogenetických informací. K získání co nejpřesnějšího cytogenetického nálezu u myelomových buněk se používají metody, které umožňují selekci této buněčné populace z buněk kostní dřeně. Jedná se o imunomagnetickou separaci v kombinaci s interfázní fluorescenční *in situ* hybridizací. *Typ studie a soubor:* Předkládáme výsledky cytogenetického vyšetření u 40 pacientů s mnohočetným myelomem. *Metody a výsledky:* Pro hodnocení vzorků kostní dřeně bylo použito G-pruhování chromosomů a interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace na neseparovaných buňkách a na buňkách separovaných metodou imunomagnetické separace pomocí CD 138 specifické protilátky. Metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace byla sledována delece v oblasti q14 na chromosomu č. 13. U neseparovaných vzorků byla delece 13q14 nalezena u 10 pacientů ze 40 (25%), u obohacené buněčné suspenze byla tato delece nalezena u 25 pacientů ze 40 (62.5%). *Závěry:* Naše výsledky potvrzují, že použitím interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace u imunomagneticky separovaných buněk lze zvýšit záchyt delece 13q14 v maligních plazmatických buňkách mnohočetného myelomu.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, imunomagnetická separace, interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace, delece 13q14

**Summary:** *Background:* Chromosomal abnormalities, such as 13q deletion, are emerging as important prognostic factors in multiple myeloma. The availability of cytogenetic information has long been hampered by the low mitotic activity of the plasma cells. To obtain a direct assessment of the myeloma cells pathology in high purity cell population, we have used magnetic-activated cell sorting in combination with interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Design and subject:* The study included 40 patients with multiple myeloma. *Methods and results:* We used chromosomal G-banding and interphase *in situ* hybridization on CD138+ and CD138- cells after selection by magnetic-activated cell separation. Hybridization was performed to detect the 13q14 deletion in unselected bone marrow cells and, in parallel, in CD138+ enriched samples. The 13q14 deletion was found in 10 of 40 (25%) of bone marrow samples without cell selection and in 25 of 40 (62.5%) of samples with CD138+ enriched myeloma cells. *Conclusions:* Our results confirm that immunomagnetic selection of CD138+ cells increases the probability of detection of the 13q14 deletion in bone marrow samples.

**Key words:** Multiple myeloma, magnetic-activated cell separation, interphase fluorescence *in situ* hybridization, 13q14 deletion

### Úvod

Cytogenetická analýza u mnohočetného myelomu je velice náročná. Důvodem je nízký počet plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich nízký mitotický index. Cytogenetické nálezy jsou přítomny ve 20 – 60% a jsou komplexní (1,2).

Mezi specifické strukturální a numerické aberace patří translokace zahrnující těžký imunoglobulinový řetězec na chromosomu 14q32 a monosomie nebo delece chromosomu č. 13. Tyto aberace byly zjištěny jak konvenčním cytogenetickým vyšetřením, tak interfázní fluorescenční *in situ* hybridizací [FISH] (3,4,5). Abnormality chromosomu č. 13 jsou spojovány se špatnou prognózou (6,7,8,9,10).

Intersticiální delece oblasti 13q14 a monosomie chromosomu č. 13 jsou asociovány s agnogení myeloidní metaplázií (AMM), mnohočetným myelomem (MM), chronickou lymfatickou leukémií (CLL), polycytemií vera (PV) a s dalšími hematologickými malignitami (4). Gen RB1 je tumor supresorový gen a má důležitou úlohu v patogenezi solidních nádorů, avšak jeho role

v onkohematologických onemocněních není doposud zcela objasněna. Nicméně jsou sekvence tohoto genu využívány jako DNA sonda při interfázní FISH k určení ztráty části nebo celého chromosomu č. 13.

Studie, které srovnávají záchyt chromosomálních abnormalit při použití klasické cytogenetické metody a metody FISH ukazují, že metoda FISH detekuje abnormality, které nejsou konvenční metodou zachytitelné (7,11,12).

Nízká mitotická aktivita plazmatických buněk a jejich slabý růst v buněčných kulturách snižuje dostupnost cytogenetických informací. Podle Pérez-Simón lze zvýšit záchyt patologických karyotypů tehdy, když jsou buňky kostní dřeně inkubovány v přítomnosti interleukinu-3 a interleukinu-6 (7).

K získání co nejpřesnějšího karyotypu myelomových buněk se používají metody, které umožňují selekci této buněčné populace z buněk z kostní dřeně. Jedná se o imunomagnetickou separaci (MACS), fluorescenční imunomagnetickou separaci (FACS) v kombinaci s interfázní FISH (13).

Cílem této studie bylo určit, zda metoda interfázni FISH detekující delecí RB1 genu na separovaných myelomových buňkách je více přínosnější než na buňkách neseparovaných. Jedná se o rozšířený soubor pacientů v návaznosti na pilotní práci Fišerová a kol. (13).

## Pacienti a metody

### Soubor pacientů a protokol studie

Kostní dřev byla získána od 40 pacientů s mnohočetným myelomem. Dvacet šest pacientů bylo nově diagnostikovaných, 10 bylo v relapsu onemocnění, 1 pacient vykazoval maximální léčebnou odpověď a 3 pacienti měli doutnající myelom. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce č. 1. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Jeden ml kostní dřevě byl zpracován standardním postupem pro genetické vyšetření, následovalo G-pruhování chromosomů a vyšetření metodou interfázni FISH.

**Tabulka č. 1: Charakteristika pacientů.**

Počet pacientů	40
Ženy	19
Muži	21
IgA	9
IgG	26
IgM	1
Bence-Jones nesekreční	2
Věk	průměr 54 (7,5) rozptyl 27–71
Stádium	I 3 II 6 III 27 nezařazeno 4

IgA, IgG, IgM, Bence-Jones – typy monoklonálního paraproteinu, stádium – stádium dle Durie-Salmon.

beccova média (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), doplněna 100 UI/ml heparinem a 100 UI/ml DNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA). Myelomové buňky byly separovány imunomagnetickou separací podle výrobce (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Mononukleární buňky kostní dřevě byly získány densitní gradientovou centrifugací na Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) při 400g, 35 min. Buňky byly 2x promyty v PBS dplněném 2mM EDTA. Po posledním promytí bylo přidáno 20 µl MACS CD 138 (Syn-decan-1) MicroBeads (Miltenyi Biotec) na celkový počet  $10^7$  buněk. Takto označená buněčná suspenze byla přefiltrována přes 30µm filtr v LS koloně (Miltenyi Biotec) umístěné v magnetickém poli separátoru Vario MACS (Miltenyi Biotec). Negativní buňky prošly kolonou, pozitivní buňky byly eluovány po odstranění kolony z magnetického pole. Byl stanoven počet buněk, jejich morfologie a imunofenotypizace.

### Morfologické hodnocení

Z nátěru kostní dřevě obarveného metodou May-Grünwald-Giemsa bylo stanoveno procento myelomových buněk. Ze separovaných buněk metodou MACS byly připraveny cytospinové preparáty a obarveny May-Grünwald-Giemsa. Bylo stanoveno procento plazmatických buněk z 250 jaderných buněk.

### Imunofenotypizace

Vstupní vzorky MBKD (mononukleární buňky kostní dřevě) stejně jako vzorky pozitivní a negativní frakce (v množství  $0,5 \times 10^6$  buněk na zkumavku) byly inkubovány s fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami (Ab) v následujících kombinacích: CD3-FITC/CD14-PE/CD19-PC7 a CD38-FITC/CD138-PE/CD45-PC5 (Immunotech, Marseille, Francie). Po 15. minutách při pokojové teplotě byly resuspendovány v PBS obsahujícím 1% paraformaldehyd pro fixaci. Flow-

cytometrická (FC) analýza byla provedena na přístroji Cyto-mics FC500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Analyzována byla populace CD38<sup>++</sup> CD45<sup>-</sup> CD45<sup>dim</sup> CD45<sup>+</sup>, znak CD138 byl hodnocen buď samostatně nebo na této populaci (13).

### Buněčná kultivace a příprava skel pro genetické vyšetření

Vzorky byly připraveny podle stávajících cytogenetických metod. Vzorky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) doplněným 20% inaktivovaným fetálním sérem 24 hodin při teplotě 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>.

### G-pruhování chromosomů

Sklíčka byla ošetřena trypsinem (Sigma-Aldrich) a obarvena Giemsou (G-pruhování). Chromosomy byly sestaveny v karyotyp podle nomenklatury ISCN 1995 (14). Za abnormální klon byl označen nálezkem dvou a více metafází se stejnou strukturální abnormalitou nebo se stejnými chromosomy navíc a nálezkem tří metafází s chybějícím stejným chromosomem.

### Interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace

Pro vyšetření pomocí FISH metody byla použita sonda LSI 13/RB-1 Spectrum Orange Probe (Vysis - Abbott), která specificky hybridizuje k sekvencím RB1 genu v oblasti 13q14 chromosomu 13 a referenční sonda LSI 13q34 Spectrum Green Probe (Vysis - Abbott). Obě sondy byly kodenaturovány při 75 °C po dobu 2 minut a hybridizovány při 37 °C přes noc ve vlhké komůrce. Poté byla sklíčka odmyta roztokem 0,4xSSC/0,3 NP-40 při 72 °C po dobu 4 minut, poté jednou v 2xSSC/0,1% NP-40 při pokojové teplotě. Sklíčka byla podbarvena DAPI II Counterstain (Vysis) a zhodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného příslušnými filtry. Obraz byl snímán CCD kamerou Cohu 9410 a analyzován pomocí software LUCIA G4.61-FISH (Laboratory Imaging, Prague, Czech Rep.). V experimentech bylo hodnoceno 50 až 100 interfázni jader.

### Statistická analýza

Byla provedena popisná analýza (průměr, rozptyl). Hodnoty určující čistotu frakcí při imunomagnetické separaci a četnosti buněk s chromosomálními abnormalitami zjištěnými metodou FISH jsou vyjádřené v procentech.

### Výsledky

#### Imunomagnetická separace

Čistota získaných frakcí je hodnocena morfologicky a flowcytometricky (FS). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2. Průměrná hodnota čistoty frakce 138+ je 98,5% (0,0–100,0%) hodnocena morfologicky z cytospinových preparátů. Hodnota z FC měření je 26,3% (rozmezí 0,1–99,1%), zde byly nalezeny dvě populace, které znak CD138 exprimovaly buď slabě či silně.

#### G-pruhování a interfázni FISH

Výsledky G-pruhování a interfázni FISH specifickou sondou pro 13q14.3 LSI D13S319 na neseparovaných a separovaných myelomových buňkách jsou uvedeny v tabulce č. 3. Hraniční hodnota pro pozitivitu interfázni FISH (cut off level) byla stanovena na 9% (13).

**Tabulka č. 2. Výsledky imunomagnetické separace.**

Vzorek	Čistota		
	Flowcytometrie	Morfologie	
	CD138+ [%] průměr (rozmezí)	CD38 <sup>++</sup> /45+/138+ [%] průměr (rozmezí)	Plazmatické buňky [%] průměr (rozmezí)
Frakce CD138+	26,3 (0,1–99,1)	23,5 (0,0–97,1)	98,5 (0,0–100,0)
Frakce CD138-	2,8 (0,0–29,9)	2,3 (0,0–27,2)	11,5 (0,0–75,0)

Uvedeny jsou hodnoty čistoty buněk z flowcytometrického měření a morfologického hodnocení.

Tabulka č. 3. Výsledky cytogenetického vyšetření.

Poř. č.	Dg.	MACS del 13q14 (%)	Sign. a/n	KD del 13q14 (%)	Sign. a/n	Karyotyp
1	nová dg.	3,0	n	4,0	n	46,XY(16)
2	nová dg.	40,0	a	10,0	a	nehodnotitelné
3	nová dg.	13,0	a	negat.	n	46,XX(19)
4	nová dg.	6,0	n	negat.	n	nehodnotitelné
5	nová dg.	4,0	n	negat.	n	46,XY(4)
6	nová dg.	47,0	a	18,0	a	46,XY(6)
7	nová dg.	11,0	a	negat.	n	46,XY(3)
8	max.od.	10,5	a	negat.	n	46,XY(7)
9	nová dg.	89,0	a	30,0	a	46,XX(16)
10	nová dg.	15,0	a	7,5	n	nehodnotitelné
11	relaps	32,0	a	negat.	n	46,XX(18)
12	relaps	36,0	a	6,0	n	nehodnotitelné
13	nová dg.	11,0	a	negat.	n	46,XY(20)
14	relaps	10,0	a	negat.	n	46,XY(15)
15	nová dg.	negat	n	negat	n	46,XY(20)
16	nová dg.	61,0	a	negat	n	46,XX(10)
17	relaps	57,0	a	negat	n	46,XY(19)
18	relaps	22,5	a	10,0	a	43,XY,-1,-10,der(11),-13,del(14q)(3)/46,XY(4)
19	nová dg.	56,0	a	negat.	n	46,XY(14)
20	relaps	negat	n	negat	n	nehodnotitelné
21	relaps	73,0	a	60,0	a	41,XX,-X,der(1),-4,der(5),-6,der(6),der(9), der(13),der(15),-22,-22
22	relaps	60,0	a	3,5	n	46,XY(5)
23	nová dg.	5,1	n	2,0	n	46,XY(5)
24	nová dg.	6,0	n	3,0	n	46,XX(5)
25	nová dg.	90,0	a	15,5	a	46,XX(7)
26	nová dg.	55,0	a	21,0	a	45,XX,+3,del(6q),del(10q),-13,-16(3)/46,XX(4)
27	doutn. m.	2,5	n	4,0	n	46,XX(4)
28	nová dg.	7,0	n	1,0	n	46,XX, del(13q)(2)/46,XX(3)
29	nová dg.	80,0	a	7,0	n	46,XX(14)
30	nová dg.	100,0	a	3,5	n	49,XY,+der(1),+der(4),+9,-13,+20(3)/46,XY(13)
31	nová dg.	7,0	n	1,0	n	46,XX(19)
32	relaps	17,0	a	5,0	n	46,XY(3)
33	nová dg.	2,0	n	0,0	n	46,XY(8)
34	doutn. m.	1,0	n	2,0	n	46,XX(9)
35	doutn. m.	negat.	n	negat.	n	46,XX (6), nekl. ztráty (4)
36	nová dg.	negat.	n	negat.	n	46,XX, t(11;14) (2), 46,XX nekl.ztráty
37	relaps	negat.	n	negat.	n	46,XY (15)
38	nová dg.	34,0	a	11,0	a	46,XY (20)
39	nová dg.	61,0	a	23,0	a	46,XX (16)
40	nová dg.	22,0	a	11,0	a	46,XY (20)

Doutn. m. – doutnající myelom, MACS del 13q14, KD del 13q14 – interfázní FISH na separovaných mononukleárních buňkách (MACS del 13q14) a neseparovaných mononukleárních buňkách (KD del 13q14), Sign. ano/ne – signifikace výsledků získaných metodou interfázní FISH, karyotyp – výsledky G-pruhování.

Z celkového počtu 55 vyšetřených pacientů metodou interfázní FISH mělo 40 pacientů reprodukovatelné výsledky.

Analýzou G-pruhování byly zjištěny numerické a strukturní aberace, především se jedná o aneuploidii respektive o derivované a deletované chromosomy.

Interfázní FISH prováděná na neseparovaných buňkách byla pozitivní v 10 případech, což představuje 25,0%. V případě separovaných myelomových buněk byla pozitivita v 25 přípa-

dech, což je 62,5%. U pacientů č. 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 29, 30, 32 bylo vyšetření na separovaných buňkách hodnoceno jako pozitivní oproti vyšetření provedeným na neseparovaných buňkách. U pacientů č. 2, 6, 9, 18, 21, 25, 26, 38, 39, 40 byla pozitivita stanovena jak na neseparovaných, tak na separovaných buňkách. U ostatních pacientů bylo vyšetření negativní jak u separované, tak u neseparované kostní dřeně. Z 26 nově diagnostikovaných pacientů bylo 16 pozitivních

v případě separovaných buněk a 8 v případě neseparovaných buněk. U 10 pacientů v relapsu bylo pozitivních 8 v případě separovaných buněk a 2 v případě neseparovaných buněk. Jeden pacient ve stádiu maximální léčebné odpovědi byl pozitivní pro delecí 13q pouze v případě separovaných buněk. Tři pacienti s diagnózou doutnající myelom byli negativní v obou případech.

U pacientů č. 18, 21, 26 se ve vyšetření karyotypu vyskytla změna na chromosomu č. 13, což koreluje s výsledky FISH na separovaných i neseparovaných buňkách. Pacient č. 30 měl v karyotypu nalezeno mimo jiné monozomii chromosomu č. 13, metodou FISH byla potvrzena pouze u separovaných buněk. U pacienta č. 28 se v karyotypu vyskytla delecce chromosomu č. 13, avšak ve vyšetření FISH tato změna byla zaznamenána v nižším procentu než stanovená 9% hranice. Pacient č. 30 měl v karyotypu nalezeno delecce chromosomu č. 13, která byla ve 100% potvrzena metodou FISH na separovaných buňkách, ale na neseparovaných buňkách se vyskytla pod hranicí 9%.

## Diskuse

Čistota pozitivní CD138+ frakce byla při FC hodnocení nižší než při hodnocení cytopsinu. Domníváme se, že existuje několik možných vysvětlení tohoto rozdílu: a) vazebná místa pro anti CD138 Ab jsou již obsazena magneticky značenou Ab a tudíž fluorescenčně značená Ab se nemůže navázat; b) v průběhu zpracování vzorku dochází k vymizení znaku CD138, přičemž Jourdan potvrdil, že apoptotické myelomové buňky ztrácejí CD138 (15). Dále Aref zjistil, že hodnoty solubilního sérového sydecanu-1 negativně korelují s jeho buněčnou formou a jejich hladiny v době diagnózy souvisí s prognózou pacientů (16). A také Yang zmiňuje, že „ztracený“, syndecan-1 může být odštěpen prostřednictvím sekretáz a uvolněn do extracelulárního prostoru (17). Bayer-Garner et al. popisuje, že slabá exprese CD138 přináležela vzorkům, jejichž buňky měly porušenou membránu a nacházely se převážně v místech fibrózy (18).

U 40 pacientů s mnohočetným myelomem jsme vyšetřovali metodou interfázní FISH přítomnost monosomie nebo delecce chromosomu č. 13. Předpokládali jsme, že obohacené vzorky kostní dřeně mohou poskytnout více informací o daných cytogenetických změnách, než vzorky připravované klasickým postupem.

U vzorků připravených klasickou technikou jsme delecí chromosomu č. 13 našli ve 25% případech a v 62,5% u separovaných vzorků. V porovnání s pilotní studií Fišerové (13) je záchyt patologie nižší (38,5% respektive 69,2%). Tento rozdíl může být způsoben v našem případě větším souborem pacientů.

Ve většině publikací se delecce 13q14 vyskytuje kolem 40% (6,12).

Tyto cytogenetické abnormality a abnormality zahrnující chromosom 11 jsou asociovány se zkrácenou dobou přežívání u pacientů, kteří podstoupili autologní transplantaci. Zatím však není znám prognostický význam chromosomových aberací detekovaných FISH u pacientů léčených konvenční chemoterapií (7).

Zaznamenali jsme rozdíly mezi výskytem delecce 13q14 u pacientů v době stanovení diagnózy a ve stádiu relapsu, kdy pacienti s novou diagnózou měli menší záchyt sledované delecce (61,5% resp. 80,0%). Podobné výsledky zaznamenali i Zojer, který publikoval záchyt této delecce použitím sondy pro lokus rb-1 v 13q14 u 46,2% pacientů s novou diagnózou a u 73,3% pacientů v relapsu (19).

Největší záchyt delecce 13q14 měli pacienti ve stádiu II. Zojer uvádí výskyt delecce 13q14 rovněž u pacientů ve stádiu I. Jiné studie potvrzují výskyt této delecce v plazmatických buňkách u pacientů s monoklonální gamapatií nejasného původu. Chromosomální abnormality jsou pozorovatelné už v časně patogenezí maligních chorob postihující plazmatické buňky (19).

Metodou G-pruhování byly nalezeny patologické karyotypy v 6 případech, což představuje 15% sledovaných pacientů. Jednalo se o strukturální a numerické aberace. Sawyer v souboru 200 pacientů zachytil abnormální klony v 32% případů (20). Obecně se u MM abnormální karyotypy zachytí u 40% pacientů. Toto procento je ovlivněno mnoha faktory, záleží na stádiu onemocnění v době diagnózy a zda byl pacient léčen před odběrem kostní dřeně pro cytogenetické vyšetření. Nález předdiploidie je považován za důležitý prognostický faktor, který je provázen špatnou odpovědí na terapii a krátkým celkovým přežitím. Hyperdiploidie je spojována s lepší prognózou, avšak může být asociována s dalšími strukturálními změnami, často se změnami chromosomu č. 13, což vede ke zhoršení prognózy (21). Strukturální přestavby bývají spojovány se špatnou prognózou (22).

Delecce 13q14 je považována za nejsilnější prognostický parametr. Pro detekci chromosomálních abnormalit se používají různé techniky, při použití G-pruhování je zachyceno 10 a více numerických a strukturálních aberací u 40% pacientů s MM. Vzhledem k nízké proliferaci myelomových buněk jsou změny v karyotypu touto metodou zachyceny pouze v 30-40% případů (12). Proto se interfázní FISH jeví jako vhodná metoda pro detekci určitých chromosomálních abnormalit. Při použití selektovaných myelomových buněk vrůstá citlivost této metody.

## Závěr

Cytogenetická analýza u mnohočetného myelomu je velice náročná pro nízký počet plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich nízký mitotický index. Cytogenetické nálezy jsou přítomny ve 20 – 60%. Po zavedení moderních molekulárně-cytogenetických metod a zejména interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace se ukazuje, že frekvence chromosomových aberací u nemocných s MM je ve skutečnosti mnohem vyšší. Delecce 13q14 je považována za nejsilnější prognostický parametr. Naše výsledky potvrzují, že použitím interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace u imunomagneticky separovaných buněk vrůstá záchyt delecce 13q14.

## Poděkování.

Tato práce je podporována grantem IGA MZ ČR NC 7043 – 3/02 a grantem MSM 143100008.

## Literatura.

1. Nishida B. K., Tamura A., Nakazawa N., at al: The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocation in multiple Myeloma and plasma cell leukemia as detected by *in situ* hybridization. *Blood* 1997, 90(2): 526-534.
2. Freinman R., Sawyer J., Hardin J., at al: Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. *Multiple Myeloma* 1997, 11(1): 1-25.
3. Harrison C. J., Mazzulo H., Cheung K.L., at al: Cytogenetics of multiple myeloma: interpretation of fluorescence *in situ* hybridization results. *British Journal of Haematology* 2003, 120: 944-952.
4. Juneau A.L., Kaehler M., Christensen E.R., at al: Detection of RB1 deletions by fluorescence *in situ* hybridization in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 103: 117-123.

5. Jarošová M., Ščudla V., Indrák K., at al: Cytogenetické vyšetření u mnohotného myelomu. I. Chromozomální nálezy u 56 nemocných. *Vnitřní lékařství* 1990, 36(11): 1072-1080.
6. Facon T., Avet-Loiseau H., Guillemin G., at al: Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum b2 microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001, 97(6): 1566-1571.
7. Peréz-Simón J.A., Garcia-Sanz R., Tabernero M.D., at al: Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998, 91(9): 3366-3371.
8. Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., at al: Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence *in situ* hybridization - defined chromosome 13

- deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *British Journal of Haematology* 2003, 120: 44-52.
9. Avet-Loiseau H., Daviet A., Brigaudeau Ch., at al: Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique. *Blood* 2001, 97(3): 822-825.
  10. Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., at al: High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000, 96(4): 1505-1511.
  11. Gutierrez N.C., Camps J., Hernandez J.M., at al: Multicolor fluorescence in situ hybridization studies in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematol J.* 2003, 4(1): 67-70.
  12. Liebisch P., Viardot A., Bassermann N., at al: Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostic in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2003, 122: 193-201.
  13. Fišerová A., Hájek R., Holubová T., at al: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma* 2002, 49(5): 300-306.
  14. Mitelman F., editor. *ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger, 1995.
  15. Jourdan M., Ferlin M., Legouffe E., Horvathova M., at al: The myeloma cell antigen Syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998, 100: 637-46.
  16. Aref S., Goda T., El-Sherbiny M.: Syndecan-1 in multiple myeloma: relationship to conventional prognostic factors. *Hematology* 2003, 8(4): 221-228.
  17. Yang Y., Yaccoby S., Liu W., J. Langford K., at al: Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 2002, 100: 610-617.
  18. Bayer – Garner I.B., Sanderson R.D., Dhodapkar M.V., at al: Syndecan-1 (CD 138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: Shed Syndecan – 1 accumulates in fibrotic regions. *Pathology, Inc.* 14(10): 1052-1058.
  19. Zojer N., Königsberg R., Ackermann J., at al: Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000, 95(6): 1925-1930.
  20. Sawyer J. R., Waldron J. A., Jagannath S., at al: Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995, 82: 41-49.
  21. Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau Ch., at al: Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001, 98(7): 2229-2238.
  22. Fonseca R., Blood E. A., Oken M. M., at al: Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002, 99(10): 3735-3741.